

Fluvoxamine の血中 BDNF に関する大うつ病性患者での検討

分担研究者 中村 純 産業医科大学精神医学教室教授

研究要旨

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)の前駆型(proBDNF)と成熟型(mBDNF)の血清中濃度を大うつ病性障害患者(MDD)群と健常者(HC)群とで比較検討した。さらに MDD 群では、fluvoxamine 投与が proBDNF, mBDNF に及ぼす検討も加えた。MDD 群では mBDNF 濃度が HC 群と比較して有意に低値であったが、proBDNF には両群間に差はなかった。

A. 研究目的

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は脳内に最も豊富に存在する神経栄養因子である。matureBDNF(mBDNF)はうつ病の病態とも深く関連している。BDNF はその precursor である proBDNF から産生される。mBDNF は神経新生やシナプス可塑性、proBDNF は神経のアポトーシスと関係している。さらに mBDNF はうつ病では低下、proBDNF は増加しているという報告もある。本研究では、大うつ病性障害(MDD)と健常者の proBDNF および matureBDNF (mBDNF)血清濃度を比較検討した。さらに MDD 患者では fluvoxamine の血清 proBDNF および mBDNF 濃度への影響も検討した。

B. 研究方法

DSM-IV の MDD の診断基準を満たす初発患者 50 例(M/F:18/32, Age: 38±19 歳)と健常者(HC)群 50 例(M/F: 16/24, Age: 35±16 歳)。MDD 群は前例 fluvoxamine 単剤で治

療された（なお benzodiazepine 系薬物の使用は 1 剤のみ可能とし研究期間中の変更は不可とした）。Endo-point は 4 週後とした。HAMD17 得点で 50%以上改善を反応群、7 点以下までの改善を寛解群と定義した。うつ状態評価はハミルトンうつ病評価尺度 17 項目(HAMD17)を用い、血清 proBDNF, mBDNF 濃度は ELISA 法、fluvoxamine 血中濃度は HPLC を用いた。本研究は産業医科大学倫理委員会の承認を受けた。

C. 結果

1 50 例中 25 例(50%)が 4 週間後までに反応群、9 例(18%)が寛解となった。2 MDD 群では HC 群と比較して有意に mBDNF 濃度が低値であった(HC:10169 ± 3917pg/ml, MDD: 8389 ± 1904pg/ml, $t=3.046$, $p=0.0018$, 1-β=82.3%)(**図 1**)。3 MDD 群と HC 群では proBDNF に差はなかった($t=-0.979$, $p=0.8333$)(**図 2**)。4 fluvoxamine

への反応群と非反応群間に mBDNF ($t=1.19$, $p=0.23$) と proBDNF ($t=1.83$, $p=0.07$) に差はなかった。5 fluvoxamine は mBDNF 濃度 ($F=0.579$, $p=0.561$) も proBDNF 濃度 ($F=2.580$, $p=0.080$) も共に 4 週間では増加させなかった。6 proBDNF/mBDNF ratio と HAMD17 改善との間には相関はなかった ($r=-0.130$, $p=0.190$) 7 proBDNF/mBDNF ratio と血中 fluvoxamine 濃度との間にも相関はなかった ($r=0.114$, $p=0.898$)

D. 考察

MDD 群では HC 群より血清 mBDNF が低値であったことは、これまでの我々の先行研究やメタ解析結果と矛盾しなかった。血清 mBDNF 濃度は MDD の state marker として有力な候補と考えられる。さらに我々は、MDD 患者では再発 3 か月前から mBDNF が低下することを報告している (J Clin Psychopharmacol, 2013)。以上のことから、mBDNF は MDD 患者を follow-up する際に再発予測マーカーとしても有用である可能性がある。今回の研究では、血清 proBDNF 濃度は MDD 群と HC 群には差は認められなかった。その一因として、今回用いた ELISA kit の検出率の低さ (50% 以下) が考えられる。より検出感度の高い ELISA kit や Western Blotting 法での検討が必要である。

E. 結論

血清 mBDNF 濃度は MDD の生物学的 marker として有用である。一方、proBDNF に関しては、そのアッセイ方法も含めてさ

らなる検討を要すると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

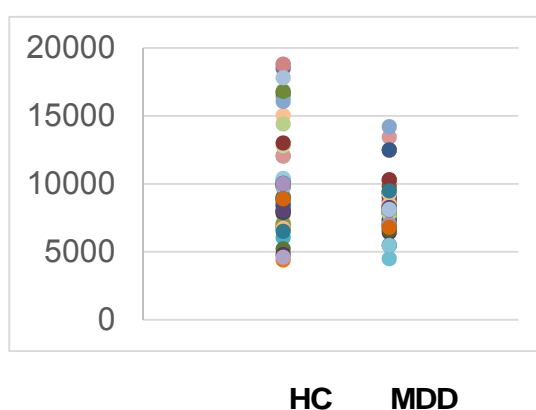
Nakamura J (他 10 名 11 番目) Serum levels of brain-derived neurotrophic factor at 4 weeks and response to treatment with SSRI. *Psychiatry Investigation*, 2014, in press.

Nakamura J (他 16 名 17 番目) COMT gene Val158Met, but not BDNF Val66Met, is associated with white matter abnormalities of the temporal lobe in patients with first-episode, treatment-naïve major depressive disorder: A diffusion tensor imaging study. *Neuropsychiatry Disease and Treatment*, 2014, in press.

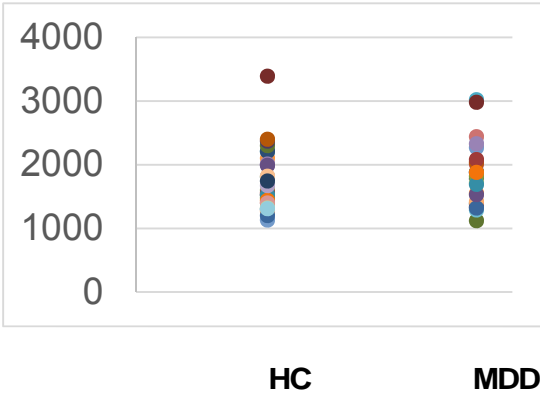
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

(図 1) mBDNF (pg/ml)



(图 2) proBDNF(pg/ml)



DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
- 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して -

分担研究者 森信 繁 高知大学医学部神経精神科学 教授

研究要旨

うつ病は ICD-10 或いは DSM-IV-TR にて診断されるが客観性に乏しく、客観的な診断バイオマーカーの開発が望まれている。うつ病発症には遺伝要因のみならず環境因の密接な関与が提唱されおり、環境因により可塑的に変化して遺伝子の転写を調節するエピジェネティクス機構の解明から、精神疾患発症の環境因として DNA メチル化の変動が注目されている。本研究では、うつ病の病態に関与し抗うつ薬の標的分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子とその受容体 TrkB 遺伝子に注目し、エクソン I 上流及びエクソン I 内の CpG アイランドのメチル化の解析を行った。BDNF 遺伝子の階層的クラスター解析によるメチル化プロファイルの解析から、エクソン I 上流及び内の CpG のメチル化解析によって、うつ病と健康対照者を分類できることがわかった。BDNF 遺伝子で計測できた 35 ヶ所の CpG のメチル化率とうつ病重症度との間に有意な関連は検出されなかった。TrkB 遺伝子のメチル化解析では、2 群を分類することはできなかった。

A. 研究目的

うつ病は世界での障害調整生命年低下要因の第二位にランクされ、自殺との密接な関与も指摘され、適切な診断や治療法の確立が必須の問題となっている。うつ病は ICD-10 或いは DSM-IV-TR にて診断されるが、客観性に乏しく診断バイオマーカーの開発が望まれている。一卵性双生児のうつ病発症一致率は最大 40% であり、うつ病発症には遺伝要因のみならず環境因の密接な関与が提唱されている。近年、環境因により可塑的に変化して遺伝子の転写を調節するエピジェネティクス機構の解明から、精神疾

患発症の環境因として DNA メチル化の変動が注目されている。先行研究から、うつ病の病態との関連が認められている脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子の、エクソン I 上流及びエクソン I 内にある CpG アイランド領域のメチル化を解析することで、うつ病の診断バイオマーカーとなる可能性が示唆されている。先行研究の結果を受けて本研究では、うつ病の病態に関与し抗うつ薬の標的分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子と BDNF の受容体 TrkB 遺伝子に注目し、エクソン I 上流及びエクソン I 内の CpG アイランドのメチル化の解析を行

い、診断及びうつ病重症度のマーカーとしての検討を行った。

B. 研究方法

未治療うつ病患者 30 名及び選択的セロトニン再取り込阻害薬単剤治療中のうつ病患者 8 名と健康対照者 30 名を対象に、末梢血を採取した。うつ病の診断は DSM-IV-TR を用いて行った。うつ病の重症度は HAM-D (Hamilton Rating Scale for Depression) で、幼少期ストレスは ETISR-SF (Early Trauma Inventory Self Report-Short Form) で評価した。

末梢血よりの genomic DNA の抽出は、DNeasy (Quiagen) を用いて行った。その後の DNA メチル化解析は、SEQUENOM 社の MassARRAY® System を用いて行った。システム内の sodium bisulfite 処理キットを用い、非メチル化シトシンのウラシルへの置換を行った。University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser と Genbank より取得した、BDNF, TrkB 遺伝子の遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内に存在する CpG アイランド領域の情報から、各 CpG アイランドをカバーする複数の PCR 用プライマーを MassARRAY® System 上の Epidesigner を用いて設計した。BDNF 遺伝子の解析領域は Chr 11: 27700049 - 27701140 で、この中にある 81 ケ所の CpG を対象とした。TrkB 遺伝子の解析領域は Chr 9: 87282548 - 87286336 で、この中にある 206 ケ所の CpG を対象とした。Methylation specific PCR 後、In

vitro transcription を施行した。U 特異的切断の後、MassARRAY MALDI-TOF MS を用いて DNA メチル化を質量分析法にて定量した後、EpiTyper を用いて DNA メチル化のデータを取得した。メチル化プロファイルによる群間分類は階層的クラスタリング法で、うつ病群と健康対照群における各 CpG メチル化率の群間差は Mann-Whitney U test で、各 CpG メチル化率と臨床症状の相関は Spearman rank correlation test で解析した。

C. 研究成果

BDNF 遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内の各 CpG のメチル化率を用いた階層的クラスタ解析から、うつ病群(未治療うつ病群と抗うつ薬治療中群を含む)と健康対照群は 2 群に分類できることが明らかとなった。今回の解析でメチル化率の計測できた 35 ケ所の各 CpG のメチル化率の比較は、うつ病群で 21 ケ所のメチル化率が健康対照群と比べて有意に低下しており、逆に 7 ケ所でのメチル化率がうつ病群で有意に増大していた。BDNF 遺伝子の CpG メチル化率と HAM-D 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。BDNF 遺伝子の CpG メチル化率と ETISR-SF 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。

TrkB 遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内の各 CpG のメチル化率を用いた階層的クラスタ解析から、うつ病群(未治療うつ病群と抗うつ薬治療中群を含む)と健康対照群は 2 群に分類でき

ないことが明らかになった。TrkB 遺伝子の CpG メチル化率と HAM-D 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。TrkB 遺伝子の CpG メチル化率と ETISR-SF 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。

D. 考察

本年度の研究結果から、BDNF 遺伝子のエクソン I 及びエクソン I 内の CpG アイランドにある 35ヶ所の CpG のメチル化プロファイルの解析によって、未治療うつ病及び抗うつ薬治療中のうつ病患者と健康対照者を分類できることが明らかとなった。今後の多数例での解析が必要ではあるが、BDNF 遺伝子のメチル化プロファイルがうつ病診断のバイオマーカーとなる可能性が提唱された。BDNF 遺伝子の各 CpG のメチル化率と HAM-D を用いたうつ病重症度との間には有意な関連はなく、メチル化率はうつ病の重症度を示すバイオマーカーには該当しないことが示唆された。幼少期の不遇な環境を評価する ETISR-SF 総得点と BDNF 遺伝子のメチル化率との間に有意な関連はなく、この結果は多くの疫学研究から幼少期の不遇な環境がうつ病発症の危険因子と報告されている点を考えると、BDNF 遺伝子のメチル化率はうつ病発症脆弱性のバイオマーカーには該当しないことを示していると考えられる。今後は抗うつ薬治療による BDNF 遺伝子のメチル化の変動と臨床症状の変化の関連を解析することによって、BDNF 遺伝子のメチル化率が抗うつ薬治療反応性を示す

サロゲートマーカーになる可能性を解析する必要があると考えられる。

その一方で BDNF の受容体である TrkB 遺伝子のメチル化も同様の方法にて解析したが、BDNF 遺伝子とは異なり TrkB 遺伝子のメチル化プロファイルではうつ病群と健康対照群を分類することはできず、うつ病診断バイオマーカーには応用できないことがわかった。BDNF 遺伝子のメチル化率と同様に、TrkB 遺伝子のメチル化率は、うつ病の重症度のバイオマーカーやうつ病発症脆弱性のバイオマーカーには応用できないことがわかった。

E. 結論

うつ病の病態関連遺伝子として注目されている BDNF 遺伝子の、エクソン I のプロモーター領域からエクソン I の 5'側に及び CpG アイランド上にある 35ヶ所の CpG のメチル化率を、うつ病患者と健康対照者の末梢血から抽出した DNA を用いて解析した。得られたメチル化率を階層的クラスター解析を用いて解析した結果、うつ病群と健康対照者群の 2 群に分類されることが明らかとなった。このような結果は、BDNF 遺伝子のエクソン I のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化プロファイルが、うつ病診断用のバイオマーカーとなりうる可能性を提唱している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) 森信 繁. エピジェネティクスからみたうつ病の病態. 精神神経学雑誌 115: 1101-1112, 2013.
- 2) 森信 繁, 淵上 学, 瀬川昌弘, 岡田 怜. BDNF 遺伝子のメチル化を用いたうつ病バイオマーカーの開発. 別冊・医学のあゆみ 148-151, 2014.

G-2. 学会発表

シンポジウム

- 1) Morinobu S. Searching for epigenetic biomarkers in PTSD. VI Japanese Society of Anxiety Disorder Academic Conference. Tokyo, 2014.2.1-2.

一般講演

- 1) Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Okada S, Okamoto Y, Yamawaki S. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. XXI World Congress of Psychiatric Genetics. Boston USA, 2014.10.17-21.
- 2) Segawa M, Morinobu S, Fuchikami M, Fujita Y, Okada S, Okamoto Y, Yamawaki S. Searching for epigenetic biomarkers in major depression: focusing on the serotonin signal transduction. XXI World Congress of Psychiatric Genetics. Boston USA, 2014.10.17-21.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業（精神障害分野）

分担研究報告書

**DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成 - 双極、単極、治療抵抗性うつ病の
識別を目指して - : 治療反応性と病態解析**

分担研究者 久住 一郎 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座精神医学
分野教授

要旨

うつ病の発症要因は、遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子であり、それぞれが複雑に影響し合うことが多くの臨床研究により明らかになってきた。しかし、子供の時の虐待と気質、成人期ライフイベントの抑うつ気分に対する相互作用はこれまで検証されていないため、本年度は一般成人でこの相互作用を検証し、仮説モデルを作成した。子供のときの虐待のうち特にネグレクトが直接的にではなく、抑うつ、循環、焦燥、不安の4つ感情気質を介して間接的に一般成人の抑うつ気分を高め、これらの4つ感情気質は過去1年間のライフイベントの否定的な評価を強め、否定的なライフイベントは抑うつ気分に対して気質よりはかなり小さいが有意な影響を与えていた。今後は、気分障害でもこの仮説モデルを検証するとともに、DNAメチル化に及ぼす子供の時の虐待の影響と他要因との相互作用を検討していく予定である。

A. 研究目的

うつ病の発症要因は、遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子であり、それぞれが複雑に影響し合うことが多くの臨床研究により明らかになってきた。これらの4因子のうち、遺伝要因と養育環境、遺伝要因と発症前ライフイベント、人格と発症前ライフイベントの3つの組み合わせについてはうつ病発症に対して相互作用を示す(Caspi et al. Science, 2003; Kendler et al. Am J Psychiatry, 2004)。しかし、それ以外の3つの組み合わせ（遺伝と人格、人格と養育環境、養育環境とライフイベン

ト)のうつ病発症に及ぼす相互作用についてはこれまで報告されていない。

うつ病発症に関与する遺伝要因は従来、出生後不変であると考えられてきた。しかし、最近DNAメチル化が幼少期のストレス(虐待)によって惹起され、遺伝子発現が出生後に修飾されることが明らかになった(Zhang et al. Neuropsychopharmacology, 2013)。このことは養育環境によって遺伝要因が後天的に変化をうける可能性を示唆しており、前述した遺伝要因(G)と環境要因(E)の相互作用(G x E 相互作用)が後天的な環境変化によってさらに変化しうることを意味している。

以上に紹介した最近の知見から、うつ病の病態、治療反応性に遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子がどのように相互作用を示すのかを検討することは重要であり、特に遺伝要因をDNAメチル化から研究することは遺伝と環境の相互作用の解明につながることで期待される。本研究では、うつ病患者群と健常者群の白血球中の mRNA 発現、DNAメチル化を多施設共同で検討を行うのと並行して、両群の子供のときの虐待、気質、成人期ライフイベントを質問紙で定量的に評価し、うつ症状、不安症状、難治性との関連を検討する。平成25年度には、まず白血球を使った生物学的マーカー以外の要因について多数例の一般成人で検討し、仮説モデルの作成、妥当性検証を行った。

B. 研究方法

募集した一般成人294名を対象として、抑うつ症状(PHQ-9)、虐待的養育環境CATS (Sanders & Becker-Lausen, 1995)の日本語版(全38項目版)、最近1年間のライフイベントに対する肯定的あるいは否定的評価Life Experiences Survey (LES) (Sarason et al., 1978)、感情気質であるTemperament Evaluation of the Memphis, Pisa, Paris, and San Diego Autoquestionnaire (TEMPS-A) (Akiskal et al., 2005)の日本語版(Matsumoto et al., 2003)による質問紙調査を匿名で行

った。なお、精神科治療歴がある被験者は除外した。

エクセル統計(エスミ)を使用し、各変数の相関とうつ症状に対する重回帰分析を行い、うつ症状に大きく影響する因子を抽出し、仮説モデルを作成した。IBM SPSS Amos 20.0を使用し、共分散構造分析最尤推定法で仮説モデルの検証を行った。

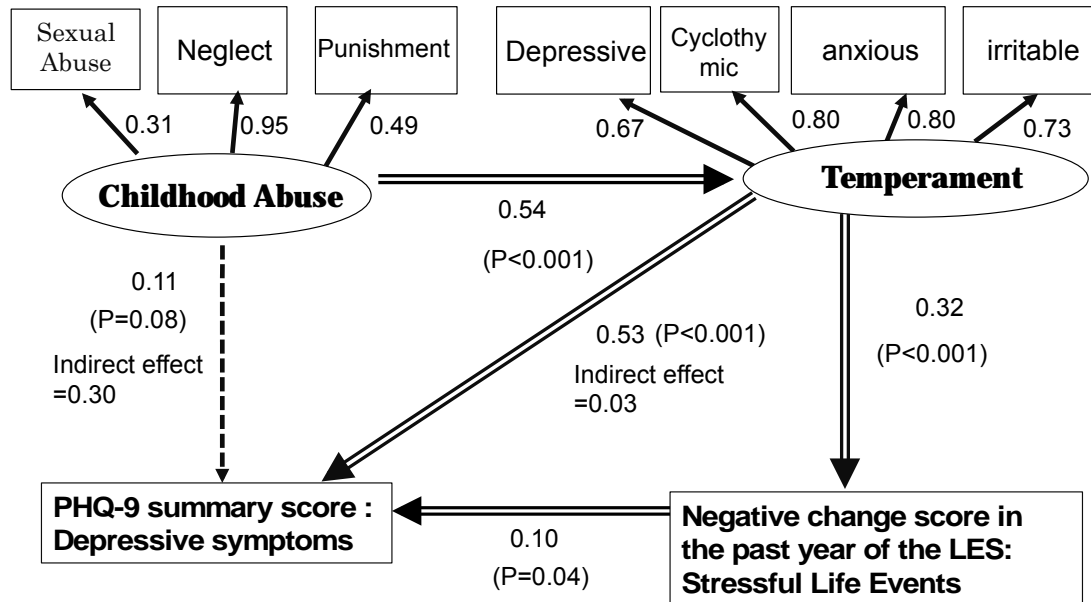
C. 研究結果

294名の一般成人は、平均年齢42.4歳、男性171例、女性123例、就労中241例、家庭の主婦43例、無職6例であった。PHQ-9総点は平均3.5点であり、大部分では大うつ病エピソードを疑われなかったが、7例のみ大うつ病エピソードを有していることが疑われた。したがって、本研究で対象とした一般成人の社会機能は十分に高く、ほとんどが非臨床集団であるといえる。

抑うつ症状は、女性、非婚姻、単身生活者、子供の時の虐待(ネグレクト/否定的家庭環境、罰)、抑うつ・循環・焦燥・不安の4感情気質、過去1年間の否定的なライフイベントによって高値となった。他方、教育年数、子供の数、身体疾患の合併、第一度親族の精神疾患家族歴、子供の時の性的虐待、発揚の感情気質、過去1年間の肯定的なライフイベントは抑うつ症状には影響を与えなかった。

抑うつ症状に統計学的に有意に関連する因子を選択して、抑うつ症状を目的変数とする重回帰分析を行った。循環気

Covariance structure analysis in 294 general adult subjects



square sums of multiple correlation coefficient = 0.41

質、不安気質、子供の時のネグレクト、過去1年間の否定的なライフイベントの4つの因子のみが、抑うつ症状を以下のような重回帰式で統計学的に有意に予測していた。

$$\text{抑うつ症状 (PHQ-9 総点)} = 5.78 \times \text{循環気点数 (1~2)} + 1.34 \times \text{CATS ネグレクト平均点数} + 0.15 \times \text{LES 否定的ライフイベント合計点数} - 9.05$$

CATS のネグレクトと罰は TEMPS-A の抑うつ、循環、不安、焦燥気質と、性的虐待は循環、不安気質と有意に相関していた。CATS の3種の虐待亜項目は相互に相関するため、それぞれの気質に対する子供のときの虐待の影響を重回帰分析したところ、ネグレクトのみが有意に

4感情気質の点数を予測していた。

以上の結果から、上の図のような構造方程式モデルを作成し、IBM SPSS Amos 20.0 を使用して共分散構造分析最尤推定法によりモデルの妥当性を確認したところ、適合度は高く、この仮説モデルは妥当であると結論した。

大うつ病性障害、双極性障害患者と健常群の区別、両気分障害の難治性と非難治性の区別にも同様の仮説モデルを当てはめたところ、良好な適合度が得られた。

D. 考察

本研究の結果から、子供のときの虐待のうち特にネグレクト(日本語では育児怠慢、育児放棄とも呼ばれる)が直接的にはなく、4つの感情気質を介して間

接的に一般成人の抑うつ気分を高めていることが明らかになった。意外なことに過去1年間の否定的なライフイベントは抑うつ気分には有意であるが、小さな影響しかもたらさなかった。さらに、抑うつ、循環、焦燥、不安の4感情気質は抑うつ気分**に強く影響を与えるとともに、**ライフイベントの否定的な評価を強めていた。このことは、気質が否定的なライフイベントを増やしているともいえるし、同じライフイベントでも感受性を高めているともいえるが、どちらの機序を介しているかは本研究の結果からは結論できない。

これまで、遺伝要因と子供の時の虐待、成人期ライフイベントが相互作用して抑うつ気分を高めているということが前方視的コホート研究で報告されてきた(Caspi et al. Science, 2003)。しかし、子供の時の虐待が気質や成人期ライフイベントとどのように相互作用して抑うつ気分**に影響を与えているか**については報告されたことがなかった。したがって、本研究は、子供のときの虐待と気質、子供のときの虐待と成人期ライフイベントが抑うつ気分**に相互作用することを明らかにした**最初の報告である。

神経症的傾向が成人期ライフイベントと相互作用してうつ病発症に促進的に働くことが前方視的研究で報告されている(Kendler et al. Am J Psychiatry, 2004)。本研究では、神経症的傾向ではなく、TEMPS-Aで評価する5つの感情気質と抑うつ気分との関連を検討した。発揚を除く4気質が抑うつ

気分と正に相関し、さらに成人期ライフイベントと相互作用して、抑うつ気分を高めていた。この結果はKendlerらの先行研究と一致した結果である。

E. 結論

うつ病発症には多因子が影響しているが、本年度の研究ではこれまで明らかではなかった子供の時の虐待と気質、成人期ライフイベントの抑うつ気分に対する相互作用を一般成人で検証し、図のような仮説モデルを提案した。今後は、気分障害でもこの仮説モデルを検証するとともに、DNAメチル化に及ぼす子供の時の虐待の影響と他要因との相互作用を検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(分担研究者分のみ)

1. 論文発表

Mitsui N, Asakura S, Inoue T, Shimizu Y, Fujii Y, Kako Y, Tanaka T, Kitagawa N, Kusumi I: Temperament and character profiles of Japanese university student suicide completers. *Compr Psychiatry* 54:556-561,2013.

Kameyama R, Inoue T, Uchida M, Tanaka T, Kitaichi Y, Nakato Y, Hayashishita Y, Nakai Y, Nakagawa S, Kusumi I, Koyama T: Development and validation of a screening questionnaire for present or past

(hypo)manic episodes based on DSM-IV-TR criteria. *J Affect Disord* 150: 546-550, 2013.

Kimura H, Osaki A, Kawashima R, Inoue T, Nakagawa S, Suzuki K, Asakura S, Tanaka T, Kitaichi Y, Masui T, Kitagawa N, Kako Y, Abekawa T, Kusumi I, Yamanaka H, Denda K, Koyama T: Differences between bipolar and unipolar depression in the Rorschach test. *Neuropsych. Dis. Treat.* 9:619-627, 2013.

Mitsui N, Asakura S, Shimizu Y, Fujii Y, Kako Y, Tanaka T, Oba K, Inoue T, Kusumi I: Temperament and character profiles of Japanese university students with depressive episodes and ideas of suicide or self-harm: a PHQ-9 screening study. *Compr Psychiatry* 54 (8):1215-1221, 2013.

Kitaichi Y, Inoue T, Mitsui N, Nakagawa S, Kameyama R, Hayashishita Y, Shiga T, Kusumi I, Koyama T: Selegiline remarkably improved stage 5 treatment-resistant major depressive disorder: a case report. *Neuropsych. Dis. Treat.* 9: 1591-1594, 2013.

Nakai Y, Inoue T, Toda H, Toyomaki A, Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y,

Kameyama R, Hayashishita Y, Wakatsuki Y, Oba K, Tanabe H, Kusumi I: The influence of childhood abuse, adult stressful life events and temperaments on depressive symptoms in the non-clinical general adult population. *J Affect Disord* 158:101-107, 2014.

Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Mimura M: The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res* 53:47-53, 2014.

2. 学会発表

Nakai Y, Inoue T, Toyomaki A, Toda H, Yasuya Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y, Kameyama R, Hayashishita Y, Kusumi I. The Influence of childhood stress, life events and temperament on depression in general adults. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 2013.6.25.

中井幸衛、井上 猛、豊巻敦人、戸田裕之、中川 伸、仲唐安哉、北市雄士、林下善行、若槻 百美、久住一郎：不安に対する子供の時のストレス、気質、成人期ライフイベントの影響 .第 6 回日本不安障害学会学術大会、東京、2014.2.1.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
- 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して -

研究分担者 関山敦生 大阪市立大学大学院医学研究科・客員研究員

要旨

うつ病の的確な診断は、社会全体の急務である。また、うつ発症者の検出に加え、誘因かつ増悪因子である精神的ストレスの的確な評価もきわめて重要と考えられる。本研究は、ごく微量の血液から血液中のタンパク質量を一括解析するプロテインアレイ技術を用いてうつ病診断と精神的ストレスの評価に応用するものである。プロテインアレイ技術を用いてうつ病患者と健常者を解析した結果、うつ病患者において血中濃度が変化している生理活性分子を発見し、それらを利用して健常者と識別可能であることが判明した。うつ病患者を対照群から識別するためには、10種程度のタンパク質測定で十分であることも判明した。平成25年度には、産業衛生フィールドにおいてストレスおよびうつ病に関する上記バイオマーカーの検討を行い、うつ病による休職者と、過去に研究分担者が蓄積したうつ病血液データとの一致、ならびに、上記血液検査とよく関連する心理テスト質問項目を見いだした。

A. 研究目的

精神、内分泌、免疫系は、相互に制御し合っており、生体防御機構を形成している。本研究は、生体防御機構の主要なメディエーターであるサイトカインが、心身のストレスに応じて特有の血中濃度プロファイルを示すことに注目。大きな社会的問題でありながら、生物学的、客観的な把握や評価が困難であったうつ病ならびに、その誘因かつ増悪因子である精神的ストレスに注目し、うつ病患者と健常者とを区分のため、また、ストレスの有無や強度を評価するための血中サイトカイン濃度パターンを明らかにする。

B. 研究方法

大阪市交通局の産業医面談に参加あるいは関山診療所にて受診または集団検診を受検した健常者、うつ病患者のうち、本研究に参加することについて文書により説明し同意が得られたものを対象とした。診断は、DSM-IV、または同TRに準拠し、重症うつ病エピソードに合致するもののほか、精神病症状をともなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害うつ病エピソードも対象とした。重篤な身体合併症を有するもの、および身体疾患治療薬を服用しているものは除外した。うつ病の評価にはハミルトン評価尺度を用い、集団検診受検者の評価には、職業性ストレス簡易調査票、GHQ28、Zung-SDSを用いた。血液2mlを採取、血

漿を遠心分離し、ミリボア社製サイトカイン・ケモカインサスペンションアレーシステムを用いての解析まで、ディープフリーザーに保管した。

測定毎、あるいは測定プレート毎のデビエーションが結果に影響することを防ぐため、全てのプレートの一部に同一のサンプルをロードし、基準サンプルとした。

うつ病者と健常者との血液サイトカインプロファイルを比較、うつ病者における血液サイトカインプロファイルをHAM-D結果と比較、健常者における血液サイトカインプロファイルを心理テスト結果とそれぞれ比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

検体については、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護した。対応票は、大市大における本研究の倫理面管理者(関山敦生)が厳重に保管し、解析を行う研究者チームには番号のみを通知する。希望者のみを対象とし、本研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で合意を取得した。尚、研究計画は兵庫医科大学倫理委員会ならびに、大阪市立大学倫理委員会の承認を平成17年に受け、以後研究体制の変更と研究経過を審査委員会に報告し、継続承認を得ている。

C. 研究結果

平成18年までに、大うつ病(ハミルトンうつ病スケール 17.1 ± 6.3 , 年齢 40.9 ± 10.6) 200人の被験者群を形成しており、さらに、その被験者群の中か

ら、うつ症状軽快(HAM-D正常化により判定)した後にも内服を続けている通院症例47名の被験者群の協力を得ている。以後の追跡検討において、サイトカイン・ケモカイン血中濃度プロファイルを用いてうつ期と回復期とを判別することができた。判別分析上でうつ病時の同プロファイルからの相違をあらわすパラメータは、HAM-D正常化に伴って増加し、健常者との相違は減少した。

今回の検討で新規にエントリーしたうつ病患者17名は、これまでに得られた判定方法で健常群と分離することができ、かつ、過去のうつ病データとの分離はできなかった(データの再現)。

精神的ストレスに関しては、これまでに120例を対象とした実験的検討によって精神的ストレス暴露者の典型的サイトカイン血中濃度プロファイルを得ており、以後はフィールドワークによって、東北太平洋沖地震救援活動従事者2800名を含む約5000名のさまざまなストレス暴露後のデータを蓄積している。

本研究においては、就労者からの集団検診受検者から、本研究に110例のエントリーを得、うち約20%に強い精神的ストレスが検出された。ほかに、健常者パターンを逸脱しているもの8名があり、そのうち4名がうつ病の治療中で、2名は適応障害のために緩和勤務中で、2名は詳細不明ながら定時に退社するよう産業医に判断されていた(データ照合の直前までは盲検的に手順を進めた)。

心理テスト等との照合の結果ではサイトカイン血中濃度プロファイルの

みによる教師なしクラスタリングの結果が、職業性ストレス簡易調査票の、職場のストレスや周囲との関係性を反映する質問枝群から得られるスコアによるグレード分けと良く一致(被検者フィールドを問わず80-85%の一致率)した。被検者の雇用元で分類すると、心理テスト上で抑うつを表す指標とサイトカインによるクラスタリングがよく一致する雇用元(78%)と、まったく一致しない雇用元(31%)とがあった。

過去のうつ病患者の追跡は現在も行っているが、難治例や精神病症状の出現など、サブタイプの変化は観察されず、よって病型の変化と血液中サイトカインマーカーとの関連を検討することはできなかった。

D. 考察

平成25年度に重点的に取り組んだのは今後複数年にわたって追跡可能な前向き研究フィールドの形成ならびに、うつ・ストレスバイオマーカーによる検討とうつ・ストレス心理テストによる検討の照合による検討であった。過去の検討の結果から、多変量解析モデルを用いることで軽中等症のうつ病および回復の評価ができる可能性が示唆されており。また、血中サイトカイン・ケモカイン濃度プロファイルは、マーカーとしての有用性のみならず病態に伴って変化することも示されていた。今年度の検討結果はこれらと一致した。ストレスに関する検討では、心理テスト(職業性ストレス簡易調査票)の主成分の一つとよく相関することが見いだされた。今後の血液検

査の用途として、他の指標の妥当性検討の一助となる可能性が示唆される。一方で就労者のグループによっては、抑うつを示す主成分との一致がきわめて低いことがあった。この理由や原因について評価を進めるとともに、結果の公開や運用方法に関しても慎重になる必要があるものとする。

E. 結論

血中サイトカイン・ケモカインは、回復の評価ならびに治療の評価に用いることができる可能性がきわめて高い。今後は、研究班で研究を推進している他のマーカーとの連携、組み合わせての適用を進め、簡便性とコスト面を考慮した測定法を完成させることにより、臨床現場で使用できるうつ病の客観的指標を確立することができると思う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

PCT 出願番号 PCT/JP2007/052887
生体負荷の指標剤および生体負荷の測定方法
筆頭出願人および発明者 関山敦生
平成25年度に

日本国(5069213号)、インド、ロシア EU 全域、中国にて特許査定(取得)

2. 実用新案登録

なし

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
- 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して -

研究分担者 松尾幸治 山口大学大学院医学系研究科高次脳機能病態学分野准教授

要旨

本研究は、うつ病患者の白血球から抽出した遺伝子メチル化修飾解析により、診断的バイオマーカーを作成することを目的とする。うつ病に特徴的な、遺伝子メチル化修飾が健常者との区別ばかりでなく、双極性障害、難治性うつ病など気分障害患者の鑑別が可能になることを目的としている。また、診断的マーカーの精度を上げるために、特定遺伝子mRNA発現も組み合わせていく。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらす、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。年間3万人以上にものぼる自殺者の多くがうつ病に罹患していたと推定される。また、怠学、失職、引きこもりなどの社会的問題やアルコール関連障害などの医学的問題にも深く関連している。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。

うつ病にはこうした社会的インパクトがあるにもかかわらず、現在のところ国際的診断基準でも主観的症状などを評価する診断面接のみである。そのため評価者間の診断のずれが生じやすく、不適切な治療となる危険性もあり、より客観的な診断法の確立が望まれている。われわれは、これまでも白血球の遺伝子発現からうつ病と双極性障害の異同を示

す臨床マーカーを報告してきた。

本研究は、うつ病患者の白血球から抽出した遺伝子メチル化修飾解析により、診断的バイオマーカーを作成することを目的とする。うつ病に特徴的な、遺伝子メチル化修飾が健常者との区別ばかりでなく、双極性障害、難治性うつ病など気分障害患者の鑑別が可能になることを目的としている。また、診断的マーカーの精度を上げるために、特定遺伝子mRNA発現も組み合わせていく。

B. 研究方法

対象は、山口大学医学部附属病院精神科神経科にて通院および入院中のうつ病患者。またポスター等により健常者を募集する。この中で、本研究に参加することについて文書および口頭にて説明を受け、研究内容を十分理解し文書にて同意を得たものを対象とする。患者は、米国精神医学会にて定められた診断基準（DSM-IV）に基づいて診断される。20歳以上の成人のみを

対象とし性別は問わない。うつ病の重症度はハミルトンうつ病スケールを用いて評価する。重篤な身体合併症および気分に影響を与えるような身体疾患(例:甲状腺機能低下症、全身性エリテマトーデスなど)を有するもの、およびステロイド薬など気分に影響を与える治療薬を服用しているものは除外する。採血は、午前8時から午前12時までの間に行う。キアゲン社製 mRNA 抽出用試験管を用いて mRNA を抽出する。

(倫理面への配慮)

研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言(2008年ソウル修正)および「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月31日厚生労働告示第415号)に従って実施する。遺伝子研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って実施する。

本研究により得られた被験者のデータについては、研究対象者は連結可能匿名化し、データのみでは個人の特定ができないよう配慮する。対応表は本研究の研究分担医師(松尾)が管理し、研究分担医師の許可なくして他の研究者が容易にアクセスできないようにする。研究成果の発表時は、解析データは集団として扱うため、個人情報特定されることはない。また、研究の本目的以外に研究で得られた被験者のデータを使用しない。共同研究施設とデータ共有する可能性があるが、その場合も個人が特定できない様に匿名化した状態でデータの提供を E-mail または郵送にて行う

遺伝情報は開示しない。その理由とし

て本研究は、多数の人および遺伝子の遺伝情報を相互に比較することにより、気分障害と遺伝子の関連や遺伝子の機能を明らかにしようとする研究であり、これらの遺伝情報がその人個人の健康状態等を評価するための情報としての精度や確実性に欠けていることから、開示することにより被験者または第三者の生命、身体などの権利利益を損なうおそれがあるためである。遺伝カウンセリングを希望の被験者は山口大学医学部附属病院遺伝外来に紹介する。

本研究は、山口大学医学部附属病院 Institutional Review Board、山口大学医学部及び医学部附属病院遺伝子解析研究審査委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

主研究施設の徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部と1回の合同会議および何度かメールのやりとりを行った。上記の研究体制を整えた。また今回の研究プロトコールに準じた血液分析の確認など予備的検討を行った。

D. 考察

被験者リクルート方法、血液分析などこの研究プロトコールを進めるめどがついた。

E. 結論

予備的検討を行い、被験者リクルート方法、血液分析などこの研究プロトコールを進めるめどがついた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（主任研究者分のみ）

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし